

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07638

研究課題名(和文)がんのエピトランスクリプトームにより制御される免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文)The role of epitranscriptome on immune escape in cancer

研究代表者

土橋 賢司(Tsuchihashi, Kenji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20773675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRNA修飾による遺伝子発現制御機構であるエピトランスクリプトームと免疫逃避機構を担う免疫チェックポイント分子発現との関連を明らかにすることである。ヒト大腸がん細胞株 HCT-116による検討で、代表的なRNA修飾であるN6-メチルアデノシンの脱メチル化酵素FTOにより、免疫チェックポイント分子PD-L1の発現が制御されることが明らかになった。一方、検討した他の大腸がんや食道がん細胞株では制御されていなかった。本研究により免疫チェックポイント分子発現がエピトランスクリプトーム制御を受けることが明らかになったとともに、がん種や細胞毎の特性が重要なことが示唆された。今後の更なる検討が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは、生体内の免疫機構から逃れながら進展していく。がんの免疫回避機構の一つとして免疫チェックポイント分子発現を介するものが知られている。その免疫チェックポイント分子発現がどのように制御されるかは完全には明らかになっていない。本研究では、RNA修飾というもともと細胞内に備わっている遺伝子発現制御システムが、免疫チェックポイント分子発現に影響することをヒトの大腸がん細胞株を用いて示した。一方、その細胞株と同様の関係が成り立たないがん細胞株もあった。まだまだ検討できていることは少なく、今後さらにこの分野の研究の進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to investigate whether epitranscriptome relates to the regulation of immune-checkpoint molecule expression such as PD-L1. Using colon cancer cell line HCT-116, N6-methyladenosine demethylase FTO related to the expression of PD-L1 in an IFN- γ -signaling-independent manner. On the other hand, other cell lines of colon cancer and esophageal cancer did not show same relation. In summary, we showed the relation of epitranscriptome and PD-L1 expression, and this relation might be dependent on the contents and kinds of cancer cells. Further investigation on the relation of epitranscriptome and immune escape system is expected.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：PD-L1 FTO N6メチルアデノシン エピトランスクリプトーム 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化やヒストン修飾などはエピゲノムと呼ばれ、遺伝子発現はこれらの修飾によりエピジェネティックに制御されていることが知られている。一方、RNA も以前よりメチル化などの修飾を受け発現が制御されていること(エピトランスクリプトーム)が知られているものの、その機能は不明であった。近年、RNA 修飾酵素の同定、また RNA 修飾に対する特異的抗体の登場により、まず正常細胞において、RNA の最も豊富な修飾である N6-メチルアデノシン(m6A)の機能解明が行われてきた。近年、がんの進展にエピトランスクリプトームが関与することが報告されている。例えば、脳腫瘍では RNA 脱メチル化酵素(ALKBH5, FTO)の発現上昇、RNA メチル化酵素(METTLL3, METTL14)の発現抑制が、がん幹細胞性の維持や腫瘍増殖に寄与することが知られている (*Cancer Cell* 2017;31:591-606, *Cell Rep* 2017;18:2622-2634)。その他、白血病、乳癌、大腸癌などでもエピトランスクリプトームががん幹細胞性をはじめがんの進展に寄与することが報告されている (*Cancer Cell* 2017;31:127-141, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E2047-56, *Oncotarget* 2017;9:7476-7486)。

一方、がんの進展には免疫監視機構から逃避することが不可欠である。このがんの「免疫逃避機構」の存在は以前より報告されていたが、近年のブレイクスルーは、臨床において免疫チェックポイント阻害薬の有効性が示されたことである。現在、CTLA-4, PD-1/PD-L1 に対する抗体薬が様々ながん腫で承認されている。CTLA-4 はおもにリンパ節などで抗原提示細胞と腫瘍抗原特異的 T 細胞が相互作用を行うプライミング相において、PD-1 は主に腫瘍組織において、腫瘍抗原特異的 T 細胞ががん細胞に結合し細胞障害を行う段階であるエフェクター相で作用し、各々のシグナルは T 細胞の活性化を抑制する。一方、PD-L1 は腫瘍細胞、一部のリンパ球、マクロファージなどに発現している。これまで、PD-L1 の発現制御機構として、インターフェロン (IFN-) 刺激による JAK-STAT 系の活性化、がん遺伝子による MAPK, PI3K/AKT シグナル系の活性化、マイクロ RNA による発現制御などが報告されている (*Ann Oncol* 2016;27:409-416, *Front Immunol* 2019;10:1337)。エピトランスクリプトームと PD-L1 発現や腫瘍の免疫逃避機構との関連は未解明である。ごく最近、悪性黒色腫において FTO の発現が腫瘍細胞の PD-1 の発現上昇への関与が報告されたのみである。(*Nat Commun* 2019; 10:2782)。PD-L1 発現制御機構を解明することは、免疫逃避機構を理解する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エピトランスクリプトームと免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現の関連を明らかにし、エピトランスクリプトームを介した腫瘍の免疫逃避機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト大腸がん細胞株を用いて、PD-L1 発現と代表的な RNA 修飾である N6-メチルアデノシンの脱メチル化修飾酵素である Fat mass and obesity-associated protein (FTO) の蛋白質、mRNA 発現を検討する。

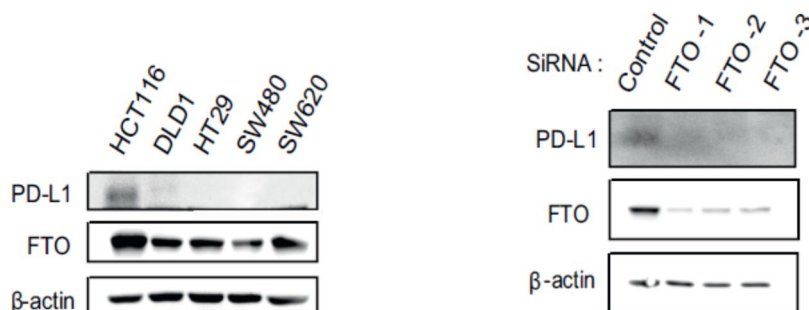
(2) FTO の発現を siRNA 法によりノックダウンした際の PD-L1 発現を検討する。

(3) IFN- の添加を行い PD-L1 発現を上昇させる条件下での FTO ノックダウンの影響を検討する。

(4) PD-L1 メッセンジャーRNA の N6-メチルアデノシン修飾、FTO 結合の有無を RNA 免疫沈降法を用いて検討する

4. 研究成果

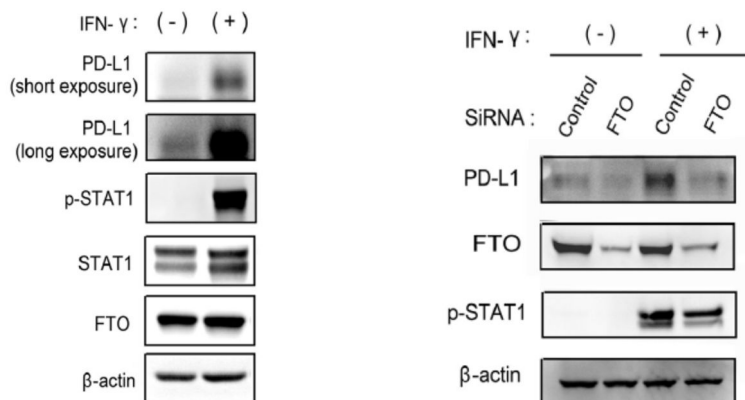
(a) FTO, PD-L1 高発現 HCT-116 細胞において FTO のノックダウンは PD-L1 発現を低下させる
ヒト大腸がん細胞株 HCT116, DLD1, HT29, SW480, SW620 を用いて、ウエスタンブロッティングにて PD-L1 発現を検討したところ、HCT116 は PD-L1, FTO の高発現を認めた(下左図)。また mRNA 発現も同様の結果であった。FTO に対する3種類の siRNA (siRNA FTO-1, -2, -3)を用いて FTO のノックダウンを行ったところ、PD-L1 発現の低下を認めた(下右図)。



(b) FTO による PD-L1 発現の制御は IFN- シグナル非依存的である

HCT116 細胞を用いて、IFN- を添加することで、PD-L1 発現の上昇を認めた(下左図)。一方、FTO をノックダウンすることで、その発現は部分的に抑制された(下右図)。一方、IFN- シグナルの活性化

の指標の一つである p-STAT1 発現レベルは FTO のノックダウンによってほとんど影響を受けなかった (下右図)。



(c) PD-L1 メッセージRNA は N6-メチルアデノシン修飾を受けている
 RNA 免疫沈降法を用いて検討した結果、PD-L1 メッセージRNA は N6-メチルアデノシン(m6A)モノクローナル抗体で沈降された (下左図)。また FTO 抗体を用いた検討でも沈降された (下右図)。よって PD-L1 メッセージRNA は N6-メチルアデノシン修飾を受けていることが明らかになった。



<引用文献>

Tsuruta N, Tsuchihashi K, Ohmura H, Yamaguchi K, Ito M, Ariyama H, Kusaba H, Akashi K, Baba E. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO regulates PD-L1 expression in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 530, 235-239 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Tsuchihashi, Yuki Hirata, Juntaro Yamasaki, Kentaro Suina, Kenro Tanoue, Toshifumi Yae, Kenta Masuda, Eishi Baba, Koichi Akashi, Yuko Kitagawa, Hideyuki Saya, Osamu Nagano	4. 巻 30
2. 論文標題 Presence and its role of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 101246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruta Nobuhiro, Tsuchihashi Kenji, Ohmura Hirofumi, Yamaguchi Kyoko, Ito Mamoru, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 530
2. 論文標題 RNA N6-methyladenosine demethylase FTO regulates PD-L1 expression in colon cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 235 ~ 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenji Tsuchihashi, Nobuhiro Tsuruta, Hirofumi Ohmura, Kyoko Yamaguchi, Mamoru Ito, Kenro Tanoue, Taichi Isobe, Hiroshi Ariyama, Hitoshi Kusaba, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 PD-L1 expression is regulated by RNA N6-methyladenosine demethylase FTO in colon cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Tsuchihashi, Juntaro Yamazaki, Kentaro Suina, Eishi Baba, Koichi Akashi, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 The model of spontaneous epithelial and mesenchymal plasticity characterized by CD44 expression in esophagus carcinoma
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Tsuchihashi, Yuki Hirata, Juntaro Yamasaki, Kentaro Suina, Kenro Tanoue, Toshifumi Yae, Kenta Masuda, Eishi Baba, Koichi Akashi, Yuko Kitagawa, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 Presence and its role of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鶴田 展大 (Tsuruta Nobuhiro)		
研究協力者	大村 洋文 (Ohmura Hirofumi)		
研究協力者	伊東 守 (Ito Mamoru)		
連携研究者	山口 享子 (Yamaguchi Kyoko) (50896933)	九州大学・病院・助教 (17102)	
連携研究者	有山 寛 (Ariyama Hiroshi) (80713437)	九州大学・病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	草場 仁志 (Kusaba Hitoshi) (80380393)	九州大学・大学院医学研究院・准教授 (17102)	
連携研究者	馬場 英司 (Baba Eishi) (00315475)	九州大学・大学院医学研究院・教授 (17102)	
連携研究者	赤司 浩一 (Akashi Koichi) (80380385)	九州大学・大学院医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関